

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09664

研究課題名(和文) 脂肪酸伸長酵素ELOVLによる脂質の質的変容を介した腎癌の進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of renal cell carcinoma progression through ELOVLs-mediated lipid metabolism

研究代表者

神鳥 周也 (Kandori, Shuya)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50707825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ELOVLは脂肪酸の伸長反応を促進する酵素である。淡明型腎細胞癌(ccRCC)は細胞内脂質が豊富であることが特徴であるが、ELOVLの役割については未だ検討はなされていない。我々は、ccRCCではELOVL2の発現が亢進し、高発現症例では予後が不良であることに着目し、研究を進めてきた。ELOVL2-KO腎癌細胞株では長鎖不飽和脂肪酸及び脂肪滴の産生が減少し、アポトーシスの促進により細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、がんの脂質代謝を介した進展メカニズムにおける新たな知見であり、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行腎癌に対しては、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が開発されてきたが、完全寛解に至る症例はまれである。脂質解析技術の発展とともに脂質の質的変容による生理活性が明らかになりつつが、がんの領域では未だ十分な解析が行われていないのが実情である。本研究では脂肪酸伸長酵素ELOVL2,5による脂質の質的変容を介した腎癌の進展メカニズムの解明と新規治療戦略の確立を目的としている。ELOVL2,5-KOマウスは致死的及び臓器形成異常などのphenotypeは認めず、臨床応用の際に有利である。本研究を通じて新規治療法が確立されれば、進行腎癌における治療戦略に重大なインパクトを与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The elongation of very long chain fatty acid (ELOVL) catalyzes the elongation of fatty acids (FAs), and is required for normal bodily functions. A hallmark of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the presence of intracellular lipid droplets (LDs). However, the roles of ELOVL remain unexplored in ccRCC. We previously showed that ELOVL2 was highly expressed in ccRCC. Furthermore, a higher level of ELOVL2 was significantly associated with a poor prognosis of patients with ccRCC. The knockout of ELOVL2 resulted in the suppression of the elongation of long chain polyunsaturated FAs and decreased LDs production in renal cancer cells. Moreover, ELOVL2 ablation resulted in the suppression of cellular proliferation via the induction of apoptosis in vitro and the attenuation of tumor growth in vivo. Collectively, the present study provides new insight into the tumor proliferation mechanisms involving lipid metabolism, and suggests that ELOVL2 may be a novel target for ccRCC therapy.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎癌 脂肪酸伸長酵素 ELOVL2 ELOVL5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 根治切除不能又は転移性の腎癌に対して分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が開発されてきたが、未だ完全寛解に至る症例は非常にまれである (Nat Rev Dis Primers 2017)。これまでの血管新生阻害や抗腫瘍免疫の活性化といった従来のメカニズムとは異なる腎癌に対する治療戦略の開発が求められている。

(2) 腎癌の約 80%を占める淡明型腎細胞癌 (clear cell Renal Cell Carcinoma: ccRCC) は、脂質合成亢進に伴う細胞内脂質の増加が特徴である (PLoS One 2010)。これまでに我々は、リン脂質であるホスファチジン酸 (Phosphatidic acid: PA) が脂質性シグナル伝達分子として ccRCC の浸潤に寄与することを明らかにし (Kandori S et al. Cancer Sci 2018) ccRCC の進展における脂質の重要性を示してきた。一方で、ccRCC におけるメタボローム解析により、悪性化による脂質の「量」の減少が生じていることが示されたが (Cancer Res 2015) その機序や役割は未だ解明されていない。脂質は生体膜成分、エネルギー源、シグナル伝達分子 (脂質の三大機能) として生体内で重要な役割を果たしている。脂質の主成分である脂肪酸は鎖長や不飽和度の違いによりその組成、いわば脂質の「質」が変化し (質的変容) 脂質の生理活性に影響を及ぼすことが知られている。このような背景に基づき、我々は ccRCC の進展に脂質の質的変容が重要な役割を果たしているという仮説のもとで研究を進めてきた。

(3) 本研究で着目する脂肪酸伸長酵素 ELOVL (elongation of very long chain fatty acid) は脂肪酸の炭素鎖の伸長反応 (鎖長の変化) により極長鎖脂肪酸 (必須脂肪酸) を合成する酵素である。我々はこれまでの研究の中で、ccRCC 症例において ELOVL2, 5 の癌部での発現が非癌部と比べ亢進し、ELOVL2, 5 高発現群で予後不良である、ELOVL2, 5 のレンチウイルスベクターによるノックダウン (KD)、CRISPR によるノックアウト (KO) により腎癌細胞株の細胞増殖 (*in vitro*, *in vivo* とともに) や浸潤が抑制される、ことを明らかにしてきた。これらの結果から、ccRCC では ELOVL2, 5 による脂質の質的変容を介して、がんの進展に影響を及ぼすことが示唆された。これまでに肺癌や前立腺癌では ELOVLs はがんの増殖を促進することが報告されているが (Cancer Res 2009, Oncotarget 2016) 脂質の三大機能にどのような影響を及ぼすことでがんの増殖に寄与するかは未だ不明である。

2. 研究の目的

- (1) ELOVL2, 5 による伸長反応が脂肪酸組成に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) 脂質の脂肪酸組成の変化が生体膜成分、エネルギー源、シグナル伝達分子としての機能に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 脂質の三大機能の変化が、がんの増殖や浸潤に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ELOVL2, 5 による脂肪酸伸長反応が脂肪酸組成に及ぼす影響の解明
LC-MS あるいは GC-MS により、ELOVL2 及び ELOVL5-KO 腎癌細胞における脂質の脂肪酸組成の変化を解析する。

(2) 網羅的遺伝子発現解析による ELOVL2, 5 の標的遺伝子の同定

RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行い、ELOVL2-KO 及び ELOVL5-KO 腎癌細胞における脂質代謝及びがんの増殖・浸潤に関連する遺伝子発現の変化を同定する。

(3) ELOVL2, 5 による脂質の質的変容を介したがんの進展メカニズムの解明

リポミクス及びトランスクリプトーム解析の結果をもとに、ELOVL2, 5 が脂質の三大機能である生体膜成分、エネルギー源、シグナル伝達分子としての機能に及ぼす影響とがんの増殖・浸潤との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムにより ELOVL2 ノックアウト腎癌細胞株 (ACHN, 786-0) ELOVL5 ノックアウト腎癌細胞株 (ACHN, 786-0) を樹立し、in vitro 及び in vivo で腫瘍増殖が抑制されることを確認した。また、これらのノックアウト細胞はアポトーシスが亢進していることが明らかとなった。

(2) GC-MS によりアラキドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の測定を行い、ELOVL2 ノックアウトにより腎癌細胞内 (ACHN) におけるこれらの長鎖脂肪酸の含有量が減少することが明らかとなった (図 1)。

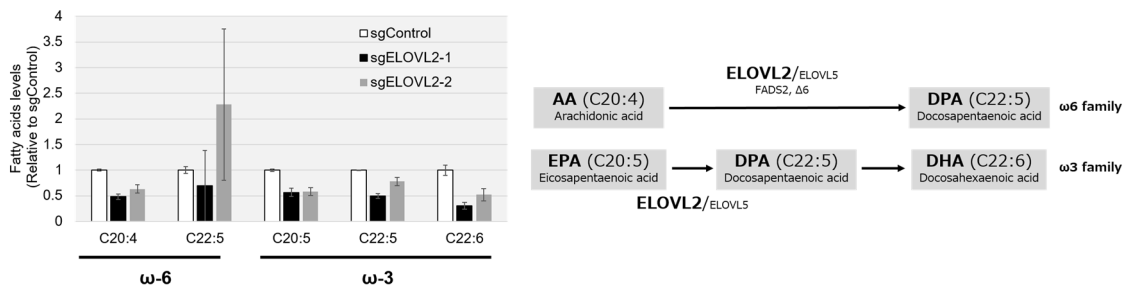


図 1 ELOVL2ノックアウトによる脂肪酸組成の変化 (ACHN)

(3) 細胞内における脂肪滴形成は淡明型腎細胞癌の特徴の 1 つであるが、これまでに ELOVL2 が線維芽細胞や肝における脂肪滴形成を促進することが証明されている (J Lipid Res. 2014, FFBS Lett. 2007)。そこで、Lipi-Green (Dojindo) による脂肪染色を行った結果、ELOVL2 ノックアウト腎癌細胞株 (ACHN) における脂肪滴が減少していることが明らかとなった (図 2)。

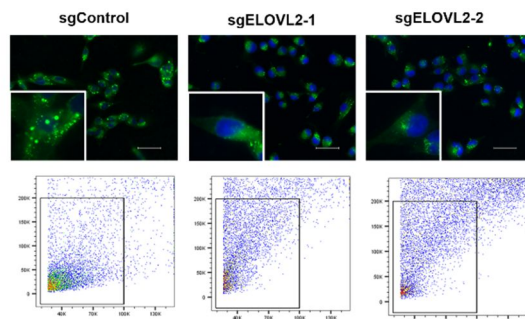


図 2 ELOVL2ノックアウトによる脂肪滴形成の変化 (ACHN)

(4) カスパーゼ 3/7 アッセイ、Annexin V 染色、JC-1 アッセイの結果から、ELOVL2 ノックアウト細胞 (ACHN) ではアポトーシスが亢進することで細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。実際に、アポトーシスを誘導する遺伝子である BAX、BAK、PUMA、NOXA の発現が亢進し、ア

ポトーシスを抑制する遺伝子である BCL2、MCL1 の発現が抑制されていた。さらに、ER Traker による小胞体染色を行った結果、ELOVL2 ノックアウト細胞では染色強度が亢進しており、ELOVL2 ノックアウトにより小胞体ストレスが誘導されたと考えられた (図 3)。実際に、IRE1 のリン酸化が促進し、CHOPをはじめとする小胞体ストレス応答遺伝子 (GADD34、s XBP1、GRP78、EDEM、BIP) の発現が亢進していた。

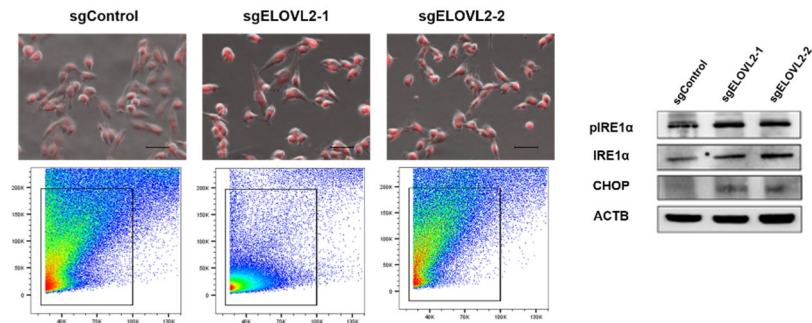


図3 ELOVL2ノックアウトによるERストレスへの影響 (ACHN)

(5) LC/ESI-MS/MS によりアラキドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の測定を行い、ELOVL5 ノックアウトにより腎癌細胞内 (ACHN) におけるこれらの長鎖脂肪酸の含有量が減少することが明らかとなった (図 4)。

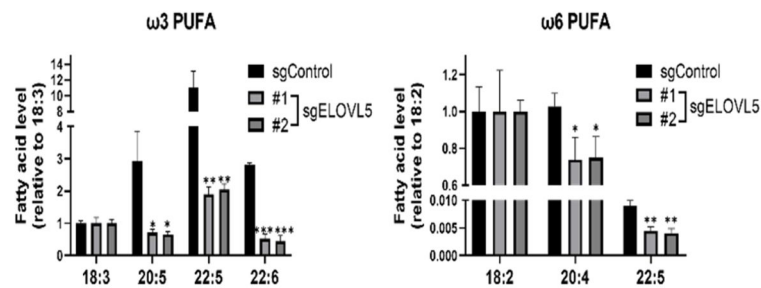


図4 ELOVL5ノックアウトによる脂肪酸組成の変化 (ACHN)

(6) RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析の結果、ELOVL5 ノックアウト腎癌細胞 (ACHN) では AKT 経路が抑制されている可能性が示唆された。今後は、トランスクリプトーム解析に基づき、ELOVL5 を介した腎癌の進展メカニズムを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Tomokazu, Ishikawa Hitoshi, Kojima Takahiro, Kandori Shuya, Kawahara Takashi, Sekino Yuta, Sakurai Hideyuki, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Bladder preservation therapy for muscle invasive bladder cancer: the past, present and future	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kandori Shuya	4. 巻 3
2. 論文標題 Editorial Comment to Advanced adrenocortical carcinoma successfully treated with gemcitabine plus capecitabine as second line chemotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 274 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Tomokazu, Kawai Koji, Kandori Shuya, Nitta Satoshi, Kojo Kosuke, Nagumo Yoshiyuki, Negoro Hiromitsu, Okuyama Ayako, Higashi Takahiro, Kojima Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Impact of centralization in primary retroperitoneal sarcoma treatment: analysis using hospital-based cancer registry data in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1687 ~ 1694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01709-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagumo Yoshiyuki, Kawai Koji, Kojima Takahiro, Shiga Masanobu, Kojo Kosuke, Tanaka Ken, Kandori Shuya, Kimura Tomokazu, Kawahara Takashi, Okuyama Ayako, Higashi Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Prognostic significance of non-urothelial carcinoma of bladder: analysis of nationwide hospital-based cancer registry data in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagumo Yoshiyuki, Kawai Koji, Kojima Takahiro, Shiga Masanobu, Kojo Kosuke, Tanaka Ken, Kandori Shuya, Kimura Tomokazu, Kawahara Takashi, Okuyama Ayako, Higashi Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognostic impact of non urothelial carcinoma of the upper urinary tract: Analysis of hospital based cancer registry data in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojo Kosuke, Kawai Koji, Kawahara Takashi, Kimura Tomokazu, Kandori Shuya, Nagumo Yoshiyuki, Nitta Satoshi, Kojima Takahiro, Okuyama Ayako, Higashi Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Recent malignant testicular tumor trend in Japan, a country with an aging population: a large-scale study of 2012-2015 hospital-based cancer registry data	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1201 ~ 1208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Shingo, Naito Sei, Numakura Kazuyuki, Kato Renpei, Koguchi Tomoyuki, Kojima Takahiro, Kawasaki Yoshihide, Kandori Shuya, Kawamura Sadafumi, Tsushima Eiki, Nishiyama Hiroyuki, Ito Akihiro, Kojima Yoshiyuki, Habuchi Tomonori, Obara Wataru, Tsuchiya Norihiko, Ohyama Chikara	4. 巻 28
2. 論文標題 Impact of cytoreductive nephrectomy in patients with primary metastatic renal cell carcinoma receiving systemic tyrosine kinase inhibitor therapy: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 369 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Akane, Negoro Hiromitsu, Kojo Kosuke, Ikeda Atsushi, Kimura Tomokazu, Kandori Shuya, Hoshi Akio, Kojima Takahiro, Kawai Koji, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Retroperitoneal lymph node dissection for testicular cancer in a patient with a double inferior vena cava	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Reports	6. 最初と最後の頁 86 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/iju5.12247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kandori Shuya, Kojima Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 421 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawahara Takashi, Kojima Takahiro, Kandori Shuya, Kurobe Masahiro, Yoshino Takayuki, Kimura Tomokazu, Nagumo Yoshiyuki, Ishituka Ryutaro, Mitsuzuka Koji, Narita Shintaro, Kobayashi Takashi, Matsui Yoshiyuki, Ogawa Osamu, Sugimoto Mikio, Miyazaki Jun, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 TP53 codon 72 polymorphism is associated with FGFR3 and RAS mutation in non-muscle-invasive bladder cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0220173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nitta Satoshi, Kawai Koji, Nagumo Yoshiyuki, Ikeda Atsushi, Kandori Shuya, Kojima Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Impact of hemoglobin levels on hemoglobin-adjusted carbon monoxide diffusion capacity after chemotherapy for testicular cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1151 ~ 1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nitta Satoshi, Kawai Koji, Kimura Tomokazu, Kawahara Takashi, Kandori Shuya, Hoshi Akio, Kojima Takahiro, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Predictors of venous thromboembolism development before and during chemotherapy for advanced germ cell tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 338 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中建、神鳥周也、小島崇宏、河原貴史、河合弘二、西山博之
2. 発表標題 ELOVL2の発現亢進は腎癌の進展に關与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術總會
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原貴史、小島崇宏、志賀正宣、田中建、神鳥周也、木村友和、河合弘二、西山博之
2. 発表標題 TB08601275<Pre 医中誌> FGFRシグナルの活性化機序により膀胱癌の腫瘍内免疫環境が異なる
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術總會
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 篤史 (Ikeda Atsushi) (50789146)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	
研究分担者	松坂 賢 (Matsuzaka Takashi) (70400679)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	河合 弘二 (Kawai Koji) (90272195)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------